

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平7-203956

(43) 公開日 平成7年(1995)8月8日

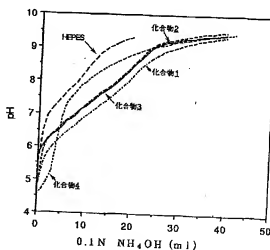
(51) IntCl. ⁸ C 1 2 N 5/06 C 0 7 D 243/08 295/14	識別記号 5 0 5 A	序内整理番号 7729-4B	F I C 1 2 N 5/ 00	技術表示箇所 E
(21) 出願番号	特願平5-5571	(71) 出願人	590005081	
(22) 出願日	平成5年(1993)1月18日		株式会社同仁化学研究所	
			熊本県上益城郡益城町田原2025-5	
		(71) 出願人	390014535	
			新技術事業団	
			埼玉県川口市本町4丁目1番8号	
		(72) 発明者	柳 栄 和彦	
			熊本県熊本市健軍町3008	
		(72) 発明者	村上 浩紀	
			福岡県福岡市東区名島4-16-16	
		(74) 代理人	弁理士 西澤 利夫	

(54) 【発明の名称】 ビス(環状ジアミン)化合物

(57) 【要約】

【構成】 pH緩衝剤として細胞培養等に有用な、次式で表わされる新規ビス(環状ジアミン)化合物

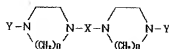
【化1】 (式中のnは2または3の数、Xは、アルキレン基、オキシアルキレン基、またはヒドロキシル基もしくはアルコキシ基置換アルキレン基あるいはオキシアルキレン基を、Yは、カルボン酸、スルホン酸または硫酸モノエステル基置換のアルキル基、ヒドロキシルアルキル基、もしくはアルコキシアルキル基を示す)



【特許請求の範囲】

【請求項 1】 次の一般式

【化 1】



(式中のnは2または3の数、Xは、アルキレン基、オキシアルキレン基、またはヒドロキシル基もしくはアルコキシル基置換アルキレン基あるいはオキシアルキレン基、Yは、カルボン酸、スルホン酸または硫酸モノエステル基置換のアルキル基、ヒドロキシアルキル基もしくはアルコキシアルキル基を示す) で表わされるビス(環状ジアミン)化合物またはそのアルカリ金属塩もしくはアンモニウム塩。

【請求項 2】 請求項 1 の化合物またはその塩からなる pH緩衝剤。

【請求項 3】 請求項 2 の pH緩衝剤を用いる細胞培養方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 この発明は、新規なビス(環状アミン)化合物に関するものである。さらに詳しくは、この発明は、動物細胞培養の pH緩衝剤等として有用なビス(環状アミン)化合物に関するものである。

【0002】

【従来の技術とその課題】 従来より、動物細胞を培養して、インシュリン、インターフェロン、成長ホルモン、抗体などの生理活性物質を生産する試みがなされている。このような動物細胞を培養する際には、培地に、アミノ酸、ビタミン類や無機物を添加するとともに、細胞が生存できる pHを維持するために pH緩衝剤を添加している。この pH緩衝剤としては、種々の血清やグッド pH緩衝剤のひとつである、2-(4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジニル)エタンスルホン酸(以下 HEPES と略記する)が広く用いられている。

【0003】 しかしながら、血清を用いる場合には、血清の品質に差異があり、安定な細胞培養が困難であることや、血清由来のタンパク質の高分子混合物から、目的とする生理活性物質を分離精製するには多くの費用と労力を必要とするなどの問題があった。また上記の HEPES の細胞毒性は強く、添加量に制限があるため、pH緩衝作用が長期間にわたって持続できないという問題もあった。

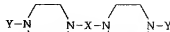
【0004】 そこで、この発明は、上記の従来技術の問題点を解決するためになされたものであって、細胞毒性が低く、pH緩衝作用が強く、かつ生理活性物質の分離精製に影響を及ぼさない pH緩衝剤を提供することを目的としている。

【0005】

【課題を解決するための手段】 この発明は、上記の課題を解決するものとして、次の一般式

【0006】

【化 2】



【0007】 (式中のnは2または3の数、Xは、アルキレン基、オキシアルキレン基、またはヒドロキシル基もしくはアルコキシル基置換アルキレン基あるいはオキシアルキレン基、Yは、カルボン酸、スルホン酸または硫酸モノエステル基置換のアルキル基、ヒドロキシアルキル基もしくはアルコキシアルキル基を示す) で表わされるビス(環状ジアミン)化合物またはそのアルカリ金属塩もしくはアンモニウム塩を提供する。

【0008】 そして、また、この発明は、上記化合物を pH緩衝剤とすることや、この緩衝剤を細胞培養に用いる方法をも提供する。すなわち、この発明の前記化合物は、たとえば動物細胞培養の pH緩衝剤や生理活性物質の生産量を増加させる添加剤として非常に有効であって、特異なビス(環状ジアミン)構造を有し、カルボン酸、スルホン酸、硫酸エステル基を結合していることを特徴としている。

【0009】 このうちのカルボン酸またはスルホン酸基を有する化合物については、その製造に際し、まず、次式

【0010】

【化 3】



【0011】 の環状ジアミン化合物を原料とし、この環状ジアミン化合物の1個のアミノ基に保護基を導入する。環状ジアミン化合物としては、ピペラジンやモビペラジンなどがその例として挙げられる。また、保護基としては、たとえば、p-トルエンシルボニル基、tert-ブトキシカルボニル基、エトキシカルボニル基、ベンジルオキシカルボニル基、アセチル基、ホルミル基、ベンジル基などが挙げられる。これらの保護基の酸無水物、酸ハロゲン化物、またはハロゲン化ベンジル等の保護基導入試薬を環状ジアミン化合物と反応させ、環状ジアミン化合物の1個のアミノ基が保護された環状ジアミン誘導体を作成する。

【0012】 次に、上記方法によって合成した保護基を有する次式

【0013】

【化 4】

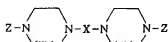


【0014】(式中のZは保護基を示している)の環状ジアミン化合物に、アルキルジハロゲン化物、ヒドロキシアルキルジハロゲン化物、アルコキシアルキルジハロゲン化物もしくはオキシアルキルジハロゲン化物を塩基の存在下で反応させるか、またはアルキルジグリシジルエーテル化合物、またはオキシアルキルジグリシジルエーテル化合物等を反応させ、ピペラジン誘導体の未保護のアミノ基を三級化し、2個のアミノ基が保護された環状ジアミン二量体を合成する。たとえばアルキルジハロゲン化物としては、1, 2-ジクロロエタン、1, 2-ジブロムエタン、1, 2-ジヨードエタン、1, 4-ジブロムブタン、1, 6-ジブロムヘキサン、1, 8-ジヨードオクトン、1, 3-ジブロム-2, 2-ジメチルプロパンなどが挙げられる。オキシアルキルジハロゲン化物としては、2, 2'-ジクロルエチルエーテル、2, 2'-ジブロムエチルエーテル、2, 2'-ジヨードエチルエーテル、エチレングリコールビス(2-クロルエチル)エーテルなどが挙げられる。アルキルジグリシジルエーテル化合物としては、エチレングリコールジグリシジルエーテル、プロピレングリコールジグリシジルエーテル、テトラメチレングリコールジグリシジルエーテル、ネオペンチレングリコールジグリシジルエーテル、1, 6-ヘキサンジオールジグリシジルエーテルなどが挙げられる。オキシアルキルジグリシジルエーテル化合物としては、ジエチレングリコールジグリシジルエーテル、トリエチレングリコールジグリシジルエーテル、テトラエチレングリコールジグリシジルエーテル、ジプロピレングリコールジグリシジルエーテルなどが挙げられる。

【0015】このようにして得られた次式

【0016】

【化5】



【0017】の環状ジアミン二量体を酸加水分解、アルカリ加水分解、または水酸化分解して保護基(Z)を除去する。そして、さらに、ハロアルキルカルボン酸、またはアルケンカルボン酸もしくはこれらのヒドロキシ基、アルコキシ基置換カルボン酸をアルカリ金属塩とし、これらと環状ジアミン二量体とを反応し、ついで、イオン交換樹脂、または電気透析により脱塩し、脱保護した環状ジアミン二量体の二級アミノ基にアルキルカルボン酸基等を導入した化合物の遊離酸を得る。たとえばこの場合のハロアルキルカルボン酸としては、モノクロル酢酸、モノブロム酢酸、3-ブロムプロピオン酸、4-ブロム酢酸、2-ブロム酢酸などが挙げられる。アル

ケンカルボン酸としては、アクリル酸、メタクリル酸などが挙げられる。

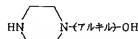
【0018】一方、スルホン酸基を導入する場合には、脱保護基処理した環状ジアミン二量体にハロアルキルスルホン酸のアルカリ金属塩、アルケンスルホン酸のアルカリ金属塩、またはアルキルスルホンとを反応させ、ついで、必要に応じイオン交換樹脂、または電気透析により脱塩し、脱保護した環状ジアミン二量体の二級アミノ基にアルキルスルホン酸基等を導入した化合物の遊離酸を得る。

【0019】たとえばこの場合のハロアルキルスルホン酸のアルカリ金属塩としては、2-ブロムエタンスルホン酸ナトリウム、3-クロル-2-ヒドロキシプロパンスルホン酸ナトリウムなどが挙げられる。アルケンスルホン酸のアルカリ金属塩としては、ビニルスルホン酸ナトリウムなどが挙げられる。アルキルスルホンとしては、プロパンスルホン、ブタンスルホンなどが挙げられる。

【0020】また、この発明化合物のうちで、硫酸モノエステル基を有する化合物を製造する場合には、まず、次式

【0021】

【化6】



【0022】のN-ヒドロキシアルキル環状ジアミン化合物等を、前記と同様にアルキルジハロゲン化物等と反応させ、その二量体を合成し、さらにクロルスルホンと反応させて硫酸モノエステルを合成する。たとえば以上のようにして製造した遊離酸は、水に溶解した後、アルカリ金属塩、またはアンモニウム塩とした陽イオン交換樹脂カラムに通し、イオン交換し、本発明化合物のアルカリ金属塩、またはアンモニウム塩を合成する。

【0023】これらの酸もしくはその塩からなるこの発明の化合物は、優れたpH緩衝剤として利用されるものである。たとえば、同一モル濃度ではpH1単位を増加させるのに、前述の従来公知の化合物であるHEPESに比べ、約2倍のアルカリ量が必要であった。すなわち、この発明の化合物は通常用いられているHEPESに比べ、より多量の酸やアルカリを加えても、pHの変動が少ないという優れたpH緩衝作用を示す。

【0024】実際、この発明の化合物を用いて、動物細胞の培養を行なったところ、生存細胞数はHEPESに比べ増加する傾向を示し、さらには、抗体の産生量もHEPESに比べ増加する傾向を示した。そこで、この発明の化合物は、動物等の細胞培養に有効に使用されるものである。たとえば具体的には、この発明の化合物を動物細胞培養用培地に添加して、HEPESを15mM添

加した培地と同様の生存細胞数とするには、培地に、この発明の化合物を2.5 mMから100 mMの濃度で、望ましくは、5 mMから75 mM添加すればよい。

【0025】この際の動物細胞としては、白血球線維芽細胞、リンパ芽細胞、ヒパ（Hela）細胞、Chinese Hamster Ovary（CHO）細胞、Baby Hamster Kidney（BHK）細胞、などの動物細胞、およびColon carcinoma、ナマルバ細胞、ヒトメラノーマ細胞などのヒト由来の腫瘍細胞を用いることができる。また、種々のミエロームと正常脾臓細胞（B-リンパ球など）が融合して生成するハイブリドーマ細胞ならびに二種のミエロームが融合して生成するハイブリッド細胞を用いることができる。

【0026】ハイブリドーマ細胞としては、HB4C5、AE6F4、AD2、HF10B4、SU-1、S PS-6、MCB-1、MB-4などが挙げられる。ハイブリッド細胞としては、MPC11×W279.1、MPC11×W279.2、MPC11×W273.1a、MPC11×W231-2などが挙げられる。

【0027】これらのハイブリドーマ細胞およびハイブリッド細胞は、組織培養7（2）、55-59、1981に記載の方法で製造することができ、またそれらはソークインステート（Salk Institute (La Jolla California)）に保存され、求めに応じ入手可能である。動物細胞培養のための基礎培地として、一般の動物細胞の培養に持ちいられるものであればいかなるものも用いることができる。具体的に好適な基礎培地としては、Dulbecco Modified Eagle Medium（DMEと略記する）、F-12、PRMI-1640、Eagle培地（これらは「組織培養」、朝倉書店（1981第5刷）、中井準之助ら編集、7〜24頁に記載されている）、E-RDF（極東製薬工業社製）などの合成培地が挙げられる。また、これらの基礎培地にインシュリン（ $2 \sim 10 \mu\text{g}/\text{ml}$ ）、トランスフェリン（ $10 \sim 35 \mu\text{g}/\text{ml}$ ）、セレンウム（ $1 \times 10^{-10} \sim 1 \times 10^{-8} \text{M}$ ）、ビルビン酸（ $0.5 \sim 5 \text{mM}$ ）、チミジン（ $1 \times 10^{-7} \sim 1 \times 10^{-6} \text{M}$ ）、ヒポキサンチン（ $1 \times 10^{-6} \sim 1 \times 10^{-4} \text{M}$ ）、エタノールアミン（ $1 \times 10^{-6} \sim 1 \times 10^{-4} \text{M}$ ）などを添加した培地も基礎培地として用いることができる。また、これらの基礎培地に、EGF、FGFなどの動物細胞成長促進因子や血清アルブミンなどを添加してもよい。

【0028】このように、この発明化合物は優れたpH緩衝作用を示す以外にも、生理活性物質の生産量を高める作用を有している。たとえば、ハイブリドーマHB4C5細胞によるIgMの生産の際に、HEPESの代りにこの発明の化合物を加えれば、HEPESを添加した培地よりも優れた結果をえることができる。そのためには、たとえばIgMの生産のために、本発明化合物を2.5 mMから100 mMの濃度で、望ましくは、5

mMから75 mM添加すればよい。

【0029】以下、実施例を示し、さらに詳しくこの発明化合物の合成方法、及びこの発明化合物を用いた動物培養方法について説明する。もちろん、この発明は、その要旨を越えない限り、以下の実施例に制約されるものではない。なお、以下の実施例では、 ^1H -NMRはブルカー社製AC200核磁気共鳴装置で、テトラメチルシラン基準、または3-（トリメチルシリル）-プロパンスルホン酸ナトリウム基準で測定した。質量分析（以下MSと略記する）は日本電子社製JMX-AX505Wを用い高速原子衝撃法（以下FABと略記する）で測定した。

【0030】

【実施例】

実施例1

1, 2-N, N'-ビス（N' ', N' ' ' -ジ（2-スルホエチル）ビベラジノ）エタン（化合物1）の合成
<A> N-tert-ブトキシカルボニルビベラジンの合成

ビベラジン40.0 g（456 mmol）を純水400 mlに溶解し、濃塩酸を加えて、pH7に調整した後、アセトン400 mlを加えた。この溶液に二炭酸ジtert-ブチル101 g（465 mmol）を滴下した後、1時間撹拌を続けた。撹拌終了後、アセトンを減圧留去し、残液中の固形物をろ別した。ろ液に10%水酸化ナトリウム200 mlを加え、pH10に調整した後、150 mlのクロロホルムで4回抽出した。このクロロホルム抽出液を150 mlの純水で3回洗浄した。洗浄後のクロロホルム抽出液を無水硫酸マグネシウムで一昼夜乾燥した後、無水硫酸マグネシウムをろ別し、クロロホルムを減圧留去した後、残液を五酸化燐上で減圧乾燥し、目的化合物を50.1 g得た。収率58%白色ワックス状物 ^1H -NMR（ CDCl_3 δ ppm）
1.46（s 9H）1.68（s 1H）2.81（t J=4.9 Hz 4H）3.38（t J=4.9 Hz 4H）MS（FAB positive）M+1=187

 1, 2-N, N'-ビス（N' ', N' ' ' -ジ（tert-ブトキシカルボニル）ビベラジノ）エタンの合成

N-tert-ブトキシカルボニルビベラジン30.0 g（161 mmol）と1, 2-ジブチルエタン14.1 g（75.0 mmol）をアセトニル180 mlに溶解し、この溶液に炭酸水素ナトリウム17.1 g（204 mmol）を加えた後、24時間、加熱還流した。加熱還流後、アセトニルを減圧留去し、残液にクロロホルム200 mlと純水300 mlを加えて溶解し、クロロホルム層を分取し、更に水層を100 mlのクロロホルムで3回抽出した。このクロロホルム層とクロロホルム抽出液を合わせ、50 mlの純水で3回洗浄

した。洗浄後のクロロホルム溶液を無水硫酸マグネシウムで一昼夜乾燥した後、無水硫酸マグネシウムをろ別し、クロロホルムを減圧留去し得られた残渣を150 mlのアセトニトリルから再結晶し、五酸化燐上で減圧乾燥し、目的化合物2.6 gを得た。収率89% 白色結晶物 $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 δ ppm) 1.46 (s 18H) 2.42 (t J=5.0 Hz 8H) 2.53 (s 4H) 3.42 (t J=5.0 Hz 8H) MS (FAB positive) M+1=399 <C> 1, 2-N, N'-ビス(ピペラジノ)エタンの合成

1, 2-N, N'-ビス(N', N'-ジ-tert-ブトキシカルボニル)ピペラジノ)エタン25.0 g (62.8 mmol)に純水200 mlと47%臭化水素酸水溶液25 gを加え、3時間加熱還流した。加熱還流後、減圧濃縮し、残渣を五酸化燐および水酸化カリウム上で減圧乾燥し、目的化合物の4臭化水素酸塩を39.4 g得た。収率120% この目的化合物の4臭化水素酸塩39.4 gを30%水酸化ナトリウム水溶液50 mlに溶解した後、減圧濃縮し残渣を100 mlのクロロホルムで5回抽出した。クロロホルム抽出液を減圧濃縮し、残渣を五酸化燐上で減圧乾燥した。減圧乾燥後、純水300 mlに溶解し、活性炭0.5 gを加え脱色した後、活性炭を除いて減圧濃縮し、得られた残渣を90 mlの純水から再結晶し、五酸化燐上で減圧乾燥して、目的化合物9.7 gを得た。収率78% 白色結晶物 $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 δ ppm) 1.67 (s 2H) 2.45 (t J=4.8 Hz 8H) 2.51 (s 4H) 2.89 (t J

=4.8 Hz 8H) MS (FAB positive) M+1=199

<D> 1, 2-N, N'-ビス(N', N'-ジ(2-スルホエチル)ピペラジノ)エタンの合成 1, 2-N, N'-ビス(ピペラジノ)エタン8.45 g (42.7 mmol)を純水150 mlに溶解し、ピニルスルホン酸ナトリウム25%水溶液54.7 g (105 mmol)を加えた後、24時間加熱還流した。加熱還流後、反応溶液を減圧濃縮し、濃縮液を希塩酸で再生した陽イオン交換樹脂(Dowex 50W-X8 200~400メッシュ)400 mlを詰めたカラムに通して、反応生成物を吸着させ、さらに純水をカラムに通して洗浄し、未反応のピニルスルホン酸を除去した。次に、0.5N水酸化アンモニウム水溶液をカラムに通して、反応生成物を溶出させた。この溶出液を80 mlまで減圧濃縮し、活性炭1.5 gを加え脱色した後、活性炭を除き、ろ液を40 mlまで減圧濃縮し、酢酸を加えて、pH4に調整した後、メタノール250 mlを加え、生成した結晶をろ取り、五酸化燐上で減圧乾燥して、目的化合物12.9 gを得た。収率73% 白色結晶物 $^1\text{H-NMR}$ ($\text{D}_2\text{O} + \text{NaOD}$ δ ppm) 2.55 (s 20H) 2.75-2.83 (m 4H) 3.07-3.15 (m 4H) MS (FAB negative) M-1=413

この化合物1の元素分析値は、化合物2~9とともに表1に示した。

【0031】

【表1】

化合物	元素分析値 (%)
<chem>OS(=O)N1CCN(CCN1C(=O)O)C(=O)O</chem> 化合物 1	計算値 C=40.56 H=7.29 N=13.52 実測値 C=40.41 H=7.27 N=13.44
<chem>OS(=O)N1CCN(CCN1C(=O)O)C(=O)O</chem> 化合物 2	計算値 C=43.42 H=7.74 N=12.66 実測値 C=43.48 H=7.70 N=12.78
<chem>OS(=O)N1CCN(CCN1C(=O)O)C(=O)O</chem> 化合物 3	計算値 C=40.49 H=7.22 N=11.81 実測値 C=40.58 H=7.32 N=11.76
<chem>OS(=O)N1CCN(CCN1C(=O)O)C(=O)O</chem> 化合物 4	計算値 C=53.49 H=8.34 N=17.82 実測値 C=53.39 H=8.30 N=17.88
<chem>OS(=O)N1CCN(CCN1C(=O)O)C(=O)O</chem> 化合物 5	計算値 C=56.12 H=8.83 N=16.36 実測値 C=56.04 H=8.90 N=16.30
<chem>OS(=O)N1CCN(CCN1C(=O)O)C(=O)O</chem> 化合物 6	計算値 C=58.35 H=9.25 N=15.12 実測値 C=58.40 H=9.18 N=15.21
<chem>OS(=O)N1CCN(CCN1C(=O)O)C(=O)O</chem> 化合物 7	計算値 C=45.94 H=8.14 N=11.90 実測値 C=46.00 H=8.09 N=11.53
<chem>OS(=O)N1CCN(CCN1C(=O)O)C(=O)O</chem> 化合物 8	計算値 C=41.91 H=7.47 N=12.22 実測値 C=41.85 H=7.61 N=12.31
<chem>OS(=O)N1CCN(CCN1C(=O)O)C(=O)O</chem> 化合物 9	計算値 C=42.69 H=7.52 N=12.66 実測値 C=42.56 H=7.61 N=12.70

【0032】実施例2

1, 2-N, N'-ビス (N', N'-ジ (3-スルホプロピル) ピペラジノ) エタン (化合物2) の合成

実施例1に示した合成法で得られた1, 2-N, N'-ビス (ピペラジノ) エタン1.50g (7.58 mmol) を脱水メタノール25mlに溶解し、プロパンスルホン2.07g (17.0 mmol) を加えた後、60℃で24時間加熱した。加熱終了後、生成した結晶をろ取り、純水10mlに溶解し、活性炭0.05gを加え脱色した後、活性炭を除き、ろ液を5mlまで減圧濃縮し、メタノール30mlを加え、生成した結晶をろ取り、五酸化磷上で減圧乾燥して、目的化合物2.45gを得た。収率73% 白色結晶物 ¹H-NMR (D₂O+NaOD δ ppm) 1.83-2.05 (m 4H) 2.07-2.85 (m 24H) 2.9

1 (t J=7.7 Hz 4H) MS (FAB negative) M-1=441

実施例3

1, 2-N, N'-ビス (N', N'-ジ (2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル) ピペラジノ) エタン (化合物3) の合成

実施例1に示した合成法で得られた1, 2-N, N'-ビス (ピペラジノ) エタン1.49g (7.53 mmol) を純水45mlに溶解し60℃に加熱した。この溶液に、3-クロロ-2-ヒドロキシスルホン酸ナトリウム2.95g (15.0 mmol) を純水40mlに溶解した溶液を30分間滴下した後、1.5時間で70℃まで昇温した。次に、この溶液に、水酸化ナトリウム0.6g (15.0 mmol) を純水40mlに溶解した溶液を30分間で滴下したのち、80℃で18.5時間加熱した。加熱終了後、反応溶液を減圧濃縮し、

濃縮液を希塩酸で再生した陽イオン交換樹脂 (Dowex 50W-X8 200~400メッシュ) 100ml を詰めたカラムに通して、反応生成物を吸着させ、さらに純水をカラムに通して洗浄し、未反応の3-クロロ-2-ヒドロキシスルホン酸を除去した。次に、0.5N水酸化アンモニウム水溶液をカラムに通して、反応生成物を溶出させ、この溶出液を20mlまで減圧濃縮し、活性炭0.25gを加え脱色した後、活性炭を除き、ろ液を10mlまで減圧濃縮し、酢酸を加えて、pH4に調整した後、エタノール150mlを加え、生成した沈澱をろ取り、五酸化磷上で減圧乾燥して、目的化合物1.42gを得た。収率40% 白色粉末状物 $^1\text{H-NMR}$ ($\text{D}_2\text{O} + \text{NaOD}$ δ ppm) 2.15-2.94 (m 24H) 3.02-3.06 (m 4H) 4.23-4.37 (m 2H) MS (FAB negative)

M-1 = 473

実施例4

1, 2-N, N'-ビス (N', N'-ジ (カルボキシメチル) ピペラジノ) エタン (化合物4) の合成モノプロム酢酸2.64g (19.0mmol) を純水10mlに5~10℃で溶解した溶液に水酸化カリウム1.40g (25.0mmol) を純水10mlに溶解した溶液を滴下し、中和した。この溶液を5℃から20℃まで昇温しながら、実施例1に示した合成法で得られた1, 2-N, N'-ビス (ピペラジノ) エタン1.49g (7.53mmol) を純水30mlに溶解した溶液を、2時間で滴下した。次に、この溶液を20℃から30℃まで昇温しながら、水酸化カリウム1.24g (22.1mmol) を純水35mlに溶解した溶液を2時間で滴下した。次に、この溶液を30℃から50℃まで2時間で昇温した後、50℃で8時間加熱した。加熱終了後、反応溶液を減圧濃縮し、濃縮液を希塩酸で再生した陽イオン交換樹脂 (Dowex 50W-X8 200~400メッシュ) 75ml を詰めたカラムに通して、反応生成物を吸着させ、さらに純水をカラムに通して洗浄し、未反応のモノプロム酢酸を除去した。次に、0.5N水酸化アンモニウム水溶液をカラムに通して、反応生成物を溶出させた。この溶出液を80mlまで減圧濃縮し、活性炭0.25gを加え脱色した後、活性炭を除き、ろ液を60mlまで減圧濃縮し、酢酸を加えて、pH5に調整した後、イソプロピルアルコール800mlを加え、生成した沈澱をろ取り、五酸化磷上で減圧乾燥した後、純水4mlから再結晶して、目的化合物0.89gを得た。収率38% 白色結晶物 $^1\text{H-NMR}$ ($\text{D}_2\text{O} + \text{NaOD}$ δ ppm) 2.54 (s 4H) 3.00 (s 20H) MS (FAB negative) M-1 = 313

実施例5

1, 2-N, N'-ビス (N', N'-ジ (2-カルボキシエチル) ピペラジノ) エタン (化合物5) の

合成

実施例1<D>に示した合成法と同様の操作で反応した。1, 2-N, N'-ビス (ピペラジノ) エタン1.49g (7.53mmol) とアクリル酸ナトリウム1.69g (18.0mmol) を純水50mlに溶解し、24時間、加熱還流した。加熱還流後、反応溶液を減圧濃縮し、濃縮液を希塩酸で再生した陽イオン交換樹脂 (Dowex 50W-X8 200~400メッシュ) 70ml を詰めたカラムに通して、反応生成物を吸着させ、さらに純水をカラムに通して洗浄し、未反応のアクリル酸を除去した。次に、0.5N水酸化アンモニウム水溶液をカラムに通して、反応生成物を溶出させた。この溶出液を減圧濃縮し、活性炭で脱色した後、活性炭を除き、ろ液を減圧濃縮し、酢酸を加えて、pH5に調整した後、イソプロピルアルコールを加え、生成した沈澱をろ取り、五酸化磷上で減圧乾燥した後、純水から再結晶して目的化合物1.33gを得た。収率52%白色結晶物 $^1\text{H-NMR}$ ($\text{D}_2\text{O} + \text{NaOD}$ δ ppm) 2.36 (t J=7.3Hz 4H) 2.43-2.96 (m 24H) MS (FAB negative) M-1 = 341

同様にして、メタクリル酸ナトリウムを用いて反応させ、1, 2-N, N'-ビス (N', N'-ジ (2-カルボキシプロピル) ピペラジノ) エタン (化合物6) を得た。表1にその元素分析値を示した。

実施例6

1, 6-N, N'-ビス (N', N'-ジ (2-スルホエチル) ピペラジノ) ヘキサン (化合物7) の合成

<A> 1, 2-N, N'-ビス (N', N'-ジ (tert-ブトキシカルボニル) ピペラジノ) ヘキサンの合成

実施例1に示した合成法と同様の操作で反応した。N-tert-ブトキシカルボニルピペラジン4.65g (25.0mmol) と1, 6-ジプロムヘキサン2.44g (10.0mmol) をアセトニトリル100mlに溶解し、この溶液に炭酸水素ナトリウム2.94g (35.0mmol) を加えた後、24時間、加熱還流した。加熱還流後、アセトニトリルを減圧留去し、残渣にクロロホルムと純水を加えて溶解し、クロロホルム層を分取し、更に水層をクロロホルムで抽出した。このクロロホルム層とクロロホルム抽出液を合わせ、純水で洗浄した。洗浄後のクロロホルム溶液を無水硫酸マグネシウムで一昼夜乾燥した後、無水硫酸マグネシウムをろ別し、クロロホルムを減圧留去し、得られた残渣をアセトニトリルから再結晶し、五酸化磷上で減圧乾燥して、目的化合物2.90gを得た。収率64% 白色結晶物 $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 δ ppm) 1.25-1.37 (m 4H) 1.38-1.58 (m 22H) 2.28-2.39 (m 12H) 3.43

(t $J=4.9$ Hz 8H) MS (FAB positive)
e) $M+1=455$

 1, 6- N , N' - β -ビス (N' , N' - β -ジ (2-スルホノエチル) ピペラジノ) ヘキサシ (化合物7) の合成

1, 2- N , N' - β -ビス (N' , N' - β -ジ (テートブトキシカルボニル) ピペラジノ) ヘキサシ 2.82 g (6.21 mmol) に純水 40 ml と 47% 臭化水素酸水溶液 26 g を加え、加熱還流した。反応溶液の一部を取り、 1H -NMR でテートブトキシカルボニル基が消失したのを確認した後、減圧濃縮した。

【0033】この濃縮残渣に純水 30 ml と水酸化ナトリウム 1.49 g (37.3 mmol) を純水 30 ml に溶解した溶液を加え、次に、ビニルスルホン酸ナトリウム 2.5% 水溶液 8.10 g (15.6 mmol) を加えた後、20 時間、加熱還流した。加熱還流後、反応溶液を減圧濃縮し、濃縮液を希塩酸で再生した陽イオン交換樹脂 (Dowex 50W-X8 200~400 メッシュ) 75 ml を詰めたカラムに通して、反応生成物を吸着させ、さらに純水をカラムに通して洗浄し、未反応のビニルスルホン酸を除去した。次に、0.5 N 水酸化アンモニウム水溶液をカラムに通して、反応生成物を溶出させた。この溶出液を 40 ml まで減圧濃縮し、活性炭 0.25 g を加え脱色した後、活性炭を除き、ろ液を 20 ml まで減圧濃縮し、酢酸を加えて、pH 4 に調整した後、メタノール 100 ml を加え、生成した結晶をろ取り、五酸化燐上で減圧乾燥して、目的化合物 2.15 g を得た。収率 74% 白色結晶物 1H -NMR ($D_2O+NaOD$ δ ppm) 1.30 (s 4H) 1.47 (s 4H) 2.05-3.03 (m 24H) 3.07-3.15 (m 4H) MS (FAB negative) $M-1=469$

実施例 7

2, 2'- β -ビス (N' -2-スルホノエチルピペラジノ) エチルエーテル (化合物 8) の合成

<A> 2, 2'- β -ビス (N' -テートブトキシカルボニルピペラジノ) エチルエーテルの合成

N -テートブトキシカルボニルピペラジン 9.30 g (50.0 mmol) と 2, 2'-ジクロロエチルエーテル 28.6 g (20.0 mmol) をアセトニトリル 200 ml に溶解し、この溶液に炭酸水素ナトリウム 5.88 g (70.0 mmol) を加えた後、24 時間加熱還流した。加熱還流後、固形物をろ別し、ろ液を減圧濃縮し、残渣をシリカゲルカラム (溶離液 酢酸エチル:メタノール=1:1) で分離精製して、目的化合物 3.54 g を得た。収率 40% 白色ワックス状物 1H -NMR ($CDCl_3$ δ ppm) 1.46 (s 18H) 2.40-2.58 (m 12H) 3.38 (t $J=5.0$ Hz 8H) 3.46 (t $J=5.4$ Hz 4H) MS (FAB positive) $M+1=443$

 2, 2'- β -ビス (N' -2-スルホノエチルピペラジノ) エチルエーテル (化合物 8) の合成

2, 2'- β -ビス (N' -テートブトキシカルボニルピペラジノ) エチルエーテル 3.32 g (7.51 mmol) をジオキサン 20 ml に溶解し、これに飽和塩酸ジオキサン溶液 40 ml を加え、1 時間静置した。生成した沈澱をろ取り、エチルエーテルで洗浄した後、五酸化燐上で減圧乾燥して、2, 2'-ジピペラジノエチルエーテル 4 塩酸塩 2.62 g を得た。収率 90% 白色粉末状物 1H -NMR ($D_2O+NaOD$ δ ppm) 2.41-2.71 (m 12H) 2.84 (t $J=5.4$ Hz 8H) 3.61 (t $J=6.4$ Hz 4H) MS (FAB positive) $M+1-4HCl=243$

さらにまた、この 2, 2'-ジピペラジノエチルエーテル 4 塩酸塩 2.50 g (6.44 mmol) を純水 30 ml に溶解し、水酸化ナトリウム 1.42 g (35.5 mmol) を純水 30 ml に溶解した溶液を加え、次に、ビニルスルホン酸ナトリウム 2.5% 水溶液 8.25 g (15.9 mmol) を加えた後、20 時間加熱還流した。加熱還流後、反応溶液を減圧濃縮し、濃縮液を希塩酸で再生した陽イオン交換樹脂 (Dowex 50W-X8 200~400 メッシュ) 80 ml を詰めたカラムに通して、反応生成物を吸着させ、さらに純水をカラムに通して洗浄し、未反応のビニルスルホン酸を除去した。次に、0.5 N 水酸化アンモニウム水溶液をカラムに通して、反応生成物を溶出させた。この溶出液を 40 ml まで減圧濃縮し、活性炭 0.25 g を加え脱色した後、活性炭を除き、ろ液を 20 ml まで減圧濃縮し、酢酸を加えて、pH 4 に調整した。これに純水 400 ml を加え、電気透析装置 (旭化成社製 マイクロアシライザー G3 分離膜 AC-110-400) を用いて脱塩した後、減圧濃縮し、残渣を五酸化燐上で減圧乾燥して、目的の化合物 8 2.15 g を得た。収率 73% 白色粉末状物 1H -NMR ($D_2O+NaOD$ δ ppm) 2.15-3.00 (m 24H) 3.07-3.15 (m 4H) 3.63 (t $J=6.5$ Hz 4H) MS (FAB negative) $M-1=457$

実施例 8

エチレンジクロール ジ (2-ヒドロキシ-3- N' -2-スルホノエチルピペラジノ) プロピル エーテル (化合物 9) の合成

<A> エチレンジクロール ジ (2-ヒドロキシ-3- N' -テートブトキシカルボニルピペラジノ) プロピル エーテルの合成

N -テートブトキシカルボニルピペラジン 7.51 g (40.4 mmol) とエチレンジクロール ジ (2-ヒドロキシ-3- N' -テートブトキシカルボニルピペラジノ) プロピル エーテル 3.12 g (17.9 mmol) をクロロホルム 40 ml に溶解し、24 時間加熱還流した。加熱還流後、固形物をろき、ろ液を減圧濃縮し、残渣をシ

リカゲルカラム (溶離液 酢酸エチル:メタノール=1:1) で分離精製して、目的化合物 8.61 g を得た。収率 91% 透明オイル状物 $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 δ ppm) 1.46 (s 18H) 2.30-2.61 (m 12H) 3.45-3.54 (m 16H) 3.67 (s 2H) 3.72-3.98 (m 2H) MS (FAB positive) $M+1=547$

 エチレングリコール ジ (2-ヒドロキシ-3- N' -tert-ブトキシカルボニルペバラジノ) プロピル) エーテル (化合物 9) の合成

エチレングリコール ジ (2-ヒドロキシ-3- N' -tert-ブトキシカルボニルペバラジノ) プロピル) エーテル 8.19 g (15.0 mmol) をジオキサン 40 ml に溶解し、これに飽和塩酸ジオキサン溶液を 80 ml を加え、1時間静置した。生成した沈澱をろ取り、エーテルで洗浄した後、五酸化燐上で減圧乾燥して、エチレングリコール ジ (2-ヒドロキシ-3-ペバラジノプロピル) エーテル 4 塩酸塩 7.01 g を得た。収率 95% 白色粉末状物 $^1\text{H-NMR}$ ($\text{D}_2\text{O} + \text{NaOD}$ δ ppm) 2.43-2.58 (m 12H) 2.81 (t $J=5.0\text{ Hz}$ 8H) 3.46 (m 4H) 3.71 (s 4H) 4.00-4.10 (m 2H) MS (FAB positive) $M+1=4\text{H}$ $\text{Cl}=347$

エチレングリコール ジ (2-ヒドロキシ-3-ペバラジノプロピル) エーテル 4 塩酸塩 6.93 g (14.1 mmol) を純水 40 ml に溶解し、水酸化ナトリウム 3.33 g (83.3 mmol) を純水 20 ml に溶解した溶液を加え、次に、ピルルスルホン酸ナトリウム 2.5% 水溶液 18.9 g (36.3 mmol) を加えた後、18時間加熱還流した。加熱還流後、反応液を減圧濃縮し、濃縮液を希塩酸で再生した陽イオン交換樹脂 (Dowex 50W-X8 200-400メッシュ) 180 ml を詰めたカラムに通して、反応生成物を吸着させ、さらに純水をカラムに通して洗浄し、未反応のピルルスルホン酸を除去した。次に、0.5N 水酸化アンモニウム水溶液をカラムに通して、反応生成物を溶出させた。この溶出液を 80 ml まで減圧濃縮し、活性炭 0.5 g を加え脱色した後、活性炭を除き、ろ液を 60 ml まで減圧濃縮し、酢酸を加えて、pH4 に調整した。これに純水 400 ml を加え、電気透析装置 (旭化成社製 マイクロアライザー-G3 分離膜 AC-110-400) を用いて脱塩した後、減圧濃縮し、残渣を五酸化燐上で減圧乾燥して、目的化合物 6.09 g を得た。収率 77% 白色粉末状物 $^1\text{H-NMR}$ ($\text{D}_2\text{O} + \text{NaOD}$ δ ppm) 2.32-2.89 (m 24H) 3.07-3.15 (m 4H) 3.41-3.60 (m 4H) 3.69 (s 4H) 4.00-4.10 (m 2H) MS (FAB negative) $M-1=561$

実施例 9

1, 2-N, N' -ビス (N' , N')-ジ (2-スルホエチル) ホモペバラジノ) エタン (化合物 10) の合成

<A> N' -tert-ブトキシカルボニルホモペバラジンの合成

実施例 1<A> に示した合成法と同様の操作で反応した。ホモペバラジン 11.6 g (116 mmol) を純水に溶解し、濃塩酸を加えて、pH7 に調整した後、アセトンを加えた。この溶液に二炭酸ジ-tert-ブチル 2.5.4 g (117 mmol) を滴下した後、1時間攪拌を続けた。攪拌終了後、アセトンを減圧留去し、残渣中の固形物をろした。ろ液に水酸化ナトリウム水溶液を加え、pH10 に調整した後、クロロホルムで抽出した。このクロロホルム抽出液を純水で洗浄した。洗浄後のクロロホルム抽出液を無水硫酸マグネシウムで一昼夜乾燥した後、無水硫酸マグネシウムを除き、クロロホルムを減圧留去した後、残渣をシリカゲルカラム (溶離液

酢酸エチル:メタノール=1:1) で分離精製して、目的化合物を 13.9 g 得た。収率 60% 無色オイル状物 $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 δ ppm) 1.46 (s 9H) 1.64 (s 1H) 1.69-1.85 (m 2H) 2.82-2.93 (m 4H) 3.38-3.52 (m 4H) MS (FAB positive) $M+1=201$

 1, 2-N, N' -ビス (N' , N')-ジ (tert-ブトキシカルボニル) ホモペバラジノ) エタンの合成

実施例 1 に示した合成法と同様の操作で反応した。 N' -tert-ブトキシカルボニルホモペバラジン 8.00 g (40.0 mmol) と 1, 2-ジブロムエタン 3.54 g (18.8 mmol) をアセトニトリルに溶解し、この溶液に炭酸水素ナトリウム 4.20 g (50.0 mmol) を加えた後、24時間加熱還流した。加熱還流後、アセトニトリルを減圧留去し、残渣にクロロホルムと純水を加えて溶解し、クロロホルム層を分取し、更に水層をクロロホルムで抽出した。このクロロホルム層とクロロホルム抽出液を合わせ、純水で洗浄した。洗浄後のクロロホルム溶液を無水硫酸マグネシウムで一昼夜乾燥した後、無水硫酸マグネシウムを除き、クロロホルムを減圧留去し、得られた残渣をシリカゲルカラム (溶離液 酢酸エチル:メタノール=1:1) で分離精製して、目的化合物 14.5 g を得た。収率 85% 無色オイル状物 $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 δ ppm) 1.46 (s 18H) 1.72-1.85 (m 4H) 2.62-2.75 (m 12H) 3.38-3.49 (m 8H) MS (FAB positive) $M+1=427$

<C> 1, 2-N, N' -ビス (N' , N')-ジ (2-スルホエチル) ホモペバラジノ) エタン (化合物 10) の合成

実施例 6に示した合成法と同様の操作で反応した。1, 2-N, N'-ビス (N'', N'''-ジ (tert-ブトキシカルボニル) ホモビペラジノ) エタン 4.26 g (10.0 mmol) に純水 40 ml と 47% 臭化水素酸水溶液 30 g を加え、加熱還流した。反応溶液の一部を取り、¹H-NMR で tert-ブトキシカルボニル基が消失したのを確認した後、減圧濃縮した。

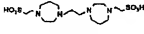
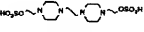
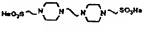
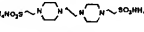
【0034】この濃縮残渣に純水 20 ml と水酸化ナトリウム 2.40 g (60.0 mmol) を純水 40 ml に溶解した溶液を加え、次に、ビニルスルホン酸ナトリウム 2.5% 水溶液 12.1 g (23.3 mmol) を加えた後、加熱還流した。加熱還流後、反応溶液を減圧濃縮し、濃縮液を希塩酸で再生した陽イオン交換樹脂 (Dowex 50W-X8 200~400メッシュ) 150 ml を詰めたカラムに通して、反応生成物を吸着させ、さ

らに純水をカラムに通して洗浄し、未反応のビニルスルホン酸を除去した。次に、0.5 N 水酸化アンモニウム水溶液をカラムに通して、反応生成物を溶出させた。この溶出液を減圧濃縮し、活性炭を加え脱色した後、活性炭を除き、ろ液を減圧濃縮し、酢酸を加えて、pH 4 に調整した後、メタノールを加え、生成した結晶をろ取り、五酸化燐上で減圧乾燥して、目的化合物 3.14 g を得た。収率 71% 白色結晶物 ¹H-NMR (D₂O + NaOD δ ppm) 1.73-1.80 (m 4H) 2.51-3.01 (m 24H) 3.05-3.15 (m 4H) MS (FAB negative) M-1 = 441

この化合物の元素分析値は、次の表 2 に、化合物 11~13 とともに示した。

【0035】

【表 2】

化合物	元素分析値 (%)
 化合物 10	計算値 C=43.42 H=7.74 N=21.69 実測値 C=43.52 H=7.80 N=21.60
 化合物 11	計算値 C=37.66 H=6.77 N=12.55 実測値 C=37.60 H=6.81 N=12.64
 化合物 12	計算値 C=36.68 H=6.16 N=12.22 実測値 C=36.58 H=6.22 N=12.31
 化合物 13	計算値 C=35.28 H=7.61 N=23.51 実測値 C=35.22 H=7.70 N=23.61

【0036】実施例 10

1, 2-N, N'-ビス (N'', N'''-ジ (2-スルホキシエチル) ビペラジノ) エタン (化合物 11) の合成

<A> 1, 2-N, N'-ビス (N'', N'''-ジ (2-ヒドロキシエチル) ビペラジノ) エタンの合成
 ビペラジノエタノール 15.6 g (120 mmol) と 1, 2-ジブromエタン 9.27 g (49.3 mmol) をアセトニトリル 50 ml に溶解し、この溶液に炭酸水素ナトリウム 12.8 g (152 mmol) を加えた後、20 時間加熱還流した。加熱還流後、固形物をろ別し、ろ液を減圧濃縮し、残渣を 50 ml のクロロホルムで 4 回抽出した。クロロホルム抽出液を減圧濃縮し、残渣をアセトニトリルから再結晶し、五酸化燐上で減圧乾燥して、目的化合物 3.00 g を得た。収率 21% 白色結晶物 ¹H-NMR (CDCl₃ δ ppm) 2.

3.8-2.73 (m 24H) 3.00 (s 2H) 3.61 (t J=5.4 Hz 4H) MS (FAB positive) M+1 = 287

 1, 2-N, N'-ビス (N'', N'''-ジ (2-スルホキシエチル) ビペラジノ) エタン (化合物 11) の合成

1, 2-N, N'-ビス (N'', N'''-ジ (2-ヒドロキシエチル) ビペラジノ) エタン 2.00 g (6.99 mmol) を 20 ml のジメチルスルホキシドに溶解し、氷浴で冷却した。この溶液にクロルスルホン酸 2.04 g (17.5 mmol) を 30 ml のジメチルスルホキシドに溶解した溶液を滴下した。滴下終了後、室温で 2 時間攪拌した。攪拌終了後、氷浴で冷却しながら、純水 50 ml を滴下し、過剰のクロルスルホン酸を分解し、次に、25% アンモニア水溶液を滴下し中和した。この溶液を減圧濃縮し、濃縮残渣を希塩酸で再生した陽

イオン交換樹脂 (Dowex 50W-X8 200~400メッシュ) 150ml を詰めたカラムに通して、反応生成物を吸着させ、さらに純水をカラムに通して洗浄した。次に、0.5N 水酸化アンモニウム水溶液をカラムを通して、反応生成物を溶出させた。この溶出液を減圧濃縮し、活性炭を加えて脱色した後、活性炭を除き、ろ液を減圧濃縮し、酢酸を加えて、pH4 に調整した後、メタノールを加え、生成した結晶をろ取り、五酸化磷上で減圧乾燥して、目的化合物 1.06g を得た。収率 34% 白色結晶物 $^1\text{H-NMR}$ ($\text{D}_2\text{O} + \text{NaOD}$ δ ppm) 2.07-2.94 (m, 24H) 3.58 (t, $J=6.4\text{Hz}$, 4H) MS (FAB negative) $M-1=445$

実施例 11

1, 2-N, N'-ビス (N', N' '-ジ (2-スルホエチル) ピペラジノ) エタン 2 ナトリウム塩 (化合物 12) の合成

実施例 1 に示した合成法で得られた 1, 2-N, N'-ビス (N', N' '-ジ (2-スルホエチル) ピペラジノ) エタン 3.12g (7.54mmol) を純水 20ml に溶解した。この溶液を 10% 塩化ナトリウム水溶液でナトリウム型とした陽イオン交換樹脂 (Dowex 50W-X8 200~400メッシュ) 100ml を詰めたカラムに通して、次に、純水をカラムに通してイオン交換を行った。流出液を減圧濃縮し、残渣にエタノール 250ml を加え、生成した沈殿をろ取り、五酸化磷上で減圧乾燥して、目的化合物 3.12g を得た。収率 90% 白色粉末状物 $^1\text{H-NMR}$ ($\text{D}_2\text{O} + \text{NaOD}$ δ ppm) 2.55 (s, 20H) 2.75-2.83 (m, 4H) 3.07-3.15 (m, 4H) MS (FAB negative) $M-Na=435$

実施例 12

1, 2-N, N'-ビス (N', N' '-ジ (2-スルホエチル) ピペラジノ) エタン 2 アンモニウム塩 (化合物 13) の合成

実施例 1 に示した合成法で得られた 1, 2-N, N'-ビス (N', N' '-ジ (2-スルホエチル) ピペラジノ) エタン 3.21g (7.75mmol) を純水 20ml に溶解した。この溶液を 10% 塩化アンモニウム水溶液でアンモニウム型とした陽イオン交換樹脂 (Dowex 50W-X8 200~400メッシュ) 100ml を詰めたカラムに通して、次に、純水をカラムに通してイオン交換を行った。流出液を減圧濃縮し、残渣にイソプロパノール 250ml を加え、生成した沈殿をろ取り、五酸化磷上で減圧乾燥して、目的化合物 3.00g

を得た。収率 86% 白色粉末状物 $^1\text{H-NMR}$ ($\text{D}_2\text{O} + \text{NaOD}$ δ ppm) 2.55 (s, 20H) 2.75-2.83 (m, 4H) 3.07-3.15 (m, 4H) MS (FAB negative) $M+1=2NH_4=413$

実施例 13

化合物 1、2、3 及び 4 の測定

化合物 1、2、3 及び 4 を 1mmol 秤取り、純水 100ml に溶解した。溶液をマグネチックスターラーで攪拌しながら、pHメーター (堀場製作所製 pHメーター F-1 pH電極 6366-10D) で pH を測定しながら、0.1N アンモニウム水溶液で滴定した。0.1N アンモニウム水溶液の滴定量と溶液の pH の関係を図 1 に示した。この発明の優れた pH 緩衝効果が認められる。

比較例 1

HEPES の測定

実施例 13 に示した方法と同様な操作で測定した。HEPES を 1mmol 秤取り、純水 100ml に溶解し、0.1N アンモニウム水溶液で滴定した。0.1N アンモニウム水溶液の滴定量と溶液の pH の関係を図 1 に示した。

実施例 14

化合物 1 から 13 を用いた動物細胞培養

ハイブリドーマ HB4C5 細胞 (1×10^5 細胞/ml) を、HEPES を含まない極東 E-RDF 培地 (極東製薬工業社製) に ITES 培地 (インシュリン $5\mu\text{g}/\text{ml}$ 、トランスフェリン $20\mu\text{g}/\text{ml}$ 、エタノールアミン $20\mu\text{M}$ 、亜セレン酸ナトリウム 20mM いずれも最終濃度) を添加した培地 (以下、ITES-E-RDF 培地と略記する) に、化合物 1 から 13 を 15mM の濃度となるように添加した培地で、ハイブリドーマ HB4C5 細胞を 37°C で 5% 炭酸ガスインキュベーター中で 4 日間培養した。培養後、生存細胞数をトリパンブルー法で測定した。また、培養液を遠心分離 ($500 \times g$, 5 分間) して得られた培養上清中の抗体 (IgM) 量を ELISA 法で定量した。その結果を次の表 3 に示した。

【0037】この発明の化合物には抗体産生の増大効果が認められる。

比較例 2

同様に HEPES についても定量し、その結果も表 3 に示した。

【0038】

【表 3】

化合物	生存細胞数 (細胞/μl)	抗体 (I g M) 量 (n g / μ l)
実施例 13		
化合物 1	6.1×10^5	91.0
化合物 2	5.0×10^5	42.5
化合物 3	4.9×10^5	41.8
化合物 4	5.1×10^5	40.7
化合物 5	4.9×10^5	40.3
化合物 6	4.8×10^5	49.9
化合物 7	4.6×10^5	43.8
化合物 8	4.6×10^5	41.5
化合物 9	4.7×10^5	40.4
化合物 10	4.7×10^5	42.1
化合物 11	5.7×10^5	44.1
化合物 12	5.9×10^5	89.4
化合物 13	6.0×10^5	88.6
比較例 2		
HEPES	4.7×10^5	40.5

【0039】実施例 14

ITES-ERDF 培地に、化合物 1 を 2.5 mM から 100 mM の濃度で添加し、実施例 13 と同様に培養した。培養後、生存細胞数をトリパンブルー法で測定した。また、培養上清中の抗体 (I g M) 量を ELISA 法で定量した。結果を表 4 に示した。

比較例 3

ITES-ERDF 培地に、HEPES を 5 mM から 50 mM の濃度で添加し、実施例 13 と同様に培養した。培養後、生存細胞数をトリパンブルー法で測定した。また、培養上清中の抗体 (I g M) 量を ELISA 法で定量した。その結果も表 4 に示した。

【0040】

【表 4】

化合物	添加濃度 (mM)	生存細胞数 (細胞/μl)	抗体 (I g M) 量 (n g / μ l)
実施例 14			
化合物 1	2.5	5.3×10^5	71.0
	5.0	5.5×10^5	75.6
	7.5	5.8×10^5	80.0
	15.0	6.1×10^5	91.0
	30.0	5.6×10^5	61.8
	60.0	4.1×10^5	52.9
	75.0	3.1×10^5	34.1
	100.0	2.7×10^5	31.0
比較例 3			
HEPES	5.0	3.3×10^5	32.0
	10.0	3.6×10^5	32.4
	15.0	4.7×10^5	40.5
	20.0	4.5×10^5	48.6
	30.0	4.0×10^5	32.6
	40.0	3.2×10^5	28.7
	50.0	3.0×10^5	32.0

【0041】実施例 15

ITES-ERDF 培地に、化合物 1 を 15 mM の濃度で添加し、第 5 表に記載のハイブリドーマ細胞、ヒトメ

ラノーマ細胞、ヒール細胞を実施例 13 と同様に培養した。培養後、生存細胞数をトリパンブルー法で測定した。結果を表 5 に示した。

比較例 4

IT ES-ERDF培地に、HEPESを15 mMの濃度で添加し、実施例 13と同様に培養した。培養後、生存細胞数をトリパンブルー法で測定した。その結果を表

5に示した。

【0042】

【表5】

細胞	実施例 13 生存細胞数 (細胞/m ²)	比較例 4 生存細胞数 (細胞/m ²)
ハイブリドーマ細胞		
AB6F4	2.9×10^5	2.7×10^5
AD2	5.0×10^5	4.5×10^5
HF10B4	2.0×10^5	1.9×10^5
SU-1	5.3×10^5	4.6×10^5
ヒトメラノーマ細胞	3.8×10^5	3.5×10^5
ヒマ細胞	4.8×10^5	4.3×10^5

【0043】

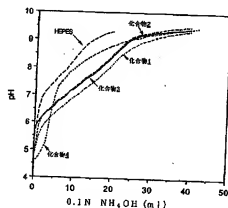
【発明の効果】この発明によって、pH緩衝剤、細胞培養へのその利用、さらには抗体産生の増大等の点に優れた効果が得られる新規ビス（環状アミン）化合物が提供

される。

【図面の簡単な説明】

【図1】この発明化合物のアンモニア水溶液による滴定曲線を例示した図である。

【図1】



【手続補正書】

【提出日】平成6年3月8日

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0032

【補正方法】変更

【補正内容】

【0032】実施例2

1, 2-N, N'-ビス (N', N''-ジ (3-スホプロピル) ピペラジノ) エタン (化合物2) の合成

実施例 1に示した合成法で得られた 1, 2-N, N'-ビス (ピペラジノ) エタン 1.50 g (7.58 mmol) を脱水メタノール 25 ml に溶解し、プロバ

ンスルトン 2.07 g (17.0 mmol) を加えた後、60℃で24時間加熱した。加熱終了後、生成した結晶をろし、純水 10 ml に溶解し、活性炭 0.05 g を加え脱色した後、活性炭を除き、ろ液を 5 ml まで減圧濃縮し、メタノール 30 ml を加え、生成した結晶をろし、五酸化燐上で減圧乾燥して、目的化合物 2.45 g を得た。収率 73% 白色結晶物 ¹H-NMR (D₂O+NaOD δ ppm) 1.83-2.05 (m 4H) 2.07-2.85 (m 24H) 2.91 (t J=7.7 Hz 4H) MS (FAB negative) M-1=441

実施例3

1, 2-N, N'-ビス (N', N''-ジ (2-

ヒドロキシ-3-スルホプロピル) ビベラジノ) エタン (化合物3) の合成

実施例1に示した合成法で得られた1, 2-N, N'-ビス(ビベラジノ)エタン1.49g (7.53 mmol)を純水45mlに溶解し60℃に加熱した。この溶液に、3-クロロ-2-ヒドロキシスルホン酸ナトリウム2.95g (15.0 mmol)を純水40mlに溶解した溶液を30分間滴下した後、1.5時間70℃まで昇温した。次に、この溶液に、水酸化ナトリウム0.6g (15.0 mmol)を純水40mlに溶解した溶液を30分間滴下したのち、80℃で18.5時間加熱した。加熱終了後、反応溶液を減圧濃縮し、濃縮液を希塩酸で再生した陽イオン交換樹脂(Dowex 50W-X8 200~400メッシュ)100mlを詰めたカラムに通して、反応生成物を吸着させ、さらに純水をカラムに通して洗浄し、未反応の3-クロロ-2-ヒドロキシスルホン酸を除去した。次に、0.5N水酸化アンモニウム水溶液をカラムに通して、反応生成物を溶出させ、この溶出液を20mlまで減圧濃縮し、活性炭0.25gを加え脱色した後、活性炭を除き、ろ液を60mlまで減圧濃縮し、ろ液を10mlまで減圧濃縮し、酢酸を加えて、pH4に調整した後、エタノール150mlを加え、生成した沈澱をろ取り、五酸化燐上で減圧乾燥して、目的化合物1.42gを得た。収率40% 白色粉末状物 ¹H-NMR (D₂O+NaOD δ ppm) 2.15-2.94 (m 24H) 3.02-3.06 (m 4H) 4.23-4.37 (m 2H) MS (FAB negative) M-1=473

M-1=473

実施例4

1, 2-N, N'-ビス(N', N''-ジ(カルボキシメチル)ビベラジノ)エタン(化合物4)の合成
モノプロム酢酸2.64g (19.0 mmol)を純水10mlに5~10℃で溶解した溶液に水酸化カリウム1.40g (25.0 mmol)を純水10mlに溶解した溶液を滴下し、中和した。この溶液を5℃から20℃まで昇温しながら、実施例1に示した合成法で得られた1, 2-N, N'-ビス(ビベラジノ)エタン1.49g (7.53 mmol)を純水30mlに溶解した溶液を、2時間滴下した。次に、この溶液を20℃から30℃まで昇温しながら、水酸化カリウム1.24g (22.1 mmol)を純水35mlに溶解した溶液を2時間滴下した。次に、この溶液を30℃から50℃まで2時間昇温した後、50℃で8時間加熱した。加熱終了後、反応溶液を減圧濃縮し、濃縮液を希塩酸で再生した陽イオン交換樹脂(Dowex 50W-X8 200~400メッシュ)75mlを詰めたカラムに通して、反応生成物を吸着させ、さらに純水をカラムに通して洗浄し、未反応のモノプロム酢酸を除去した。次に、0.5N水酸化アンモニウム水溶液をカラムに通して、反応生成物を溶出させた。この溶出液を80mlま

で減圧濃縮し、活性炭0.25gを加え脱色した後、活性炭を除き、ろ液を60mlまで減圧濃縮し、酢酸を加えて、pH5に調整した後、イソプロピルアルコール800mlを加え、生成した沈澱をろ取り、五酸化燐上で減圧乾燥した後、純水4mlから再結晶して、目的化合物0.89gを得た。収率38% 白色結晶物 ¹H-NMR (D₂O+NaOD δ ppm) 2.54 (s 4H) 3.00 (s 20H) MS (FAB negative) M-1=313

実施例5

1, 2-N, N'-ビス(N', N''-ジ(2-カルボキシエチル)ビベラジノ)エタン(化合物5)の合成

実施例1<D>に示した合成法と同様の操作で反応した。1, 2-N, N'-ビス(ビベラジノ)エタン1.49g (7.53 mmol)とアクリル酸ナトリウム1.69g (18.0 mmol)を純水50mlに溶解し、24時間、加熱還流した。加熱還流後、反応溶液を減圧濃縮し、濃縮液を希塩酸で再生した陽イオン交換樹脂(Dowex 50W-X8 200~400メッシュ)70mlを詰めたカラムに通して、反応生成物を吸着させ、さらに純水をカラムに通して洗浄し、未反応のアクリル酸を除去した。次に、0.5N水酸化アンモニウム水溶液をカラムに通して、反応生成物を溶出させた。この溶出液を減圧濃縮し、活性炭で脱色した後、活性炭を除き、ろ液を減圧濃縮し、酢酸を加えて、pH5に調整した後、イソプロピルアルコールを加え、生成した沈澱をろ取り、五酸化燐上で減圧乾燥した後、純水から再結晶して目的化合物1.33gを得た。収率52% 白色結晶物 ¹H-NMR (D₂O+NaOD δ ppm) 2.36 (t J=7.3 Hz 4H) 2.43-2.96 (m 24H) MS (FAB negative) M-1=341

同様に、メタクリル酸ナトリウムを用いて反応させ、1, 2-N, N'-ビス(N', N''-ジ(2-カルボキシプロピル)ビベラジノ)エタン(化合物6)を得た。表1にその元素分析値を示した。

実施例6

1, 6-N, N'-ビス(N', N''-ジ(2-スルホノエチル)ビベラジノ)ヘキサン(化合物7)の合成

<A> 1, 6-N, N'-ビス(N', N''-ジ(tert-ブトキシカルボニル)ビベラジノ)ヘキサンの合成

実施例1に示した合成法と同様の操作で反応した。N-tert-ブトキシカルボニルビベラジノ4.65g (25.0 mmol)と1, 6-ジプロムヘキサン2.44g (10.0 mmol)をアセトニトリル100mlに溶解し、この溶液に炭酸水素ナトリウム2.94g (35.0 mmol)を加えた後、24時間、加

熱還流した。加熱還流後、アセトニトリルを減圧留去し、残渣にクロロホルムと純水を加えて溶解し、クロロホルム層を分取し、更に水層をクロロホルムで抽出した。このクロロホルム層とクロロホルム抽出液を合わせ、純水で洗浄した。洗浄後のクロロホルム溶液を無水硫酸マグネシウムで一昼夜乾燥した後、無水硫酸マグネシウムをろ別し、クロロホルムを減圧留去し、得られた残渣をアセトニトリルから再結晶し、五酸化燐上で減圧乾燥して、目的化合物 2.90 g を得た。収率 64 %

白色結晶物 $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 δ ppm) 1.25-1.37 (m, 4H) 1.38-1.58 (m, 22H) 2.28-2.39 (m, 12H) 3.43 (t, $J=4.9\text{ Hz}$, 8H) MS (FAB positive) $M+1=445$

 1, 2-N, N'-ビス (N'', N'''-ジ (2-ヒドロキシエチル) ビベラジノ) ヘキサノ (化合物 1) の合成

1, 2-N, N'-ビス (N'', N'''-ジ (tert-ブトキシカルボニル) ビベラジノ) ヘキサノ 2.82 g (6.21 mmol) に純水 40 ml と 4 % 臭化水素酸水溶液 26 g を加え、加熱還流した。反応溶液の一部を取り、 $^1\text{H-NMR}$ で tert-ブトキシカルボニル基が消失したのを確認した後、減圧濃縮した。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0036

【補正方法】変更

【補正内容】

【0036】実施例 10

1, 2-N, N'-ビス (N'', N'''-ジ (2-スルホエチル) ビベラジノ) エタン (化合物 11) の合成

<A> 1, 2-N, N'-ビス (N'', N'''-ジ (2-ヒドロキシエチル) ビベラジノ) エタンの合成

ビベラジンエタノール 15.6 g (120 mmol) と 1, 2-ジブromoエタン 9.27 g (49.3 mmol) をアセトニトリル 50 ml に溶解し、この溶液に炭酸水素ナトリウム 12.8 g (152 mmol) を加えた後、20 時間加熱還流した。加熱還流後、固形物をろ別し、ろ液を減圧濃縮し、残渣を 50 ml のクロロホルムで 4 回抽出した。クロロホルム抽出液を減圧濃縮し、残渣をアセトニトリルから再結晶し、五酸化燐上で減圧乾燥して、目的化合物 3.00 g を得た。収率 21 %

白色結晶物 $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 δ ppm) 2.38-2.73 (m, 24H) 3.00 (s, 2H) 3.61 (t, $J=5.4\text{ Hz}$, 4H) MS (FAB positive) $M+1=287$

 1, 2-N, N'-ビス (N'', N'''-ジ (2-スルホエチル) ビベラジノ) エタン (化合物 11) の合成

1, 2-N, N'-ビス (N'', N'''-ジ (2-ヒドロキシエチル) ビベラジノ) エタン 2.00 g (6.99 mmol) を 20 ml のジメチルスルホキシドに溶解し、氷浴で冷却した。この溶液にクロルスルホン酸 2.04 g (17.5 mmol) を 30 ml のジメチルスルホキシドに溶解した溶液を滴下した。滴下終了後、室温で 2 時間攪拌した。攪拌終了後、氷浴で冷却しながら、純水 50 ml を滴下し、過剰のクロルスルホン酸を分解し、次に、25 % アンモニア水溶液を滴下し中和した。この溶液を減圧濃縮し、濃縮残渣を希塩酸で再生した陽イオン交換樹脂 (Dowex 50W-X8 200~400 メッシュ) 150 ml を詰めたカラムに通して、反応生成物を吸着させ、さらに純水をカラムに通して洗浄した。次に、0.5 N 水酸化アンモニウム水溶液をカラムに通して、反応生成物を溶出させた。この溶出液を減圧濃縮し、活性炭を加え脱色した後、活性炭を除き、ろ液を減圧濃縮し、酢酸を加えて、pH4 に調整した後、メタノールを加え、生成した結晶をろ取し、五酸化燐上で減圧乾燥して、目的化合物 1.06 g を得た。収率 34 %

白色結晶物 $^1\text{H-NMR}$ ($\text{D}_2\text{O} + \text{NaOD}$ δ ppm) 2.07-2.94 (m, 24H) 3.58 (t, $J=6.4\text{ Hz}$, 4H) MS (FAB negative) $M-1=445$

実施例 11

1, 2-N, N'-ビス (N'', N'''-ジ (2-スルホエチル) ビベラジノ) エタン 2 ナトリウム塩 (化合物 12) の合成

実施例 1 に示した合成法で得られた 1, 2-N, N'-ビス (N'', N'''-ジ (2-スルホエチル) ビベラジノ) エタン 3.12 g (7.54 mmol) を純水 20 ml に溶解した。この溶液を 10 % 塩化ナトリウム水溶液でナトリウム型とした陽イオン交換樹脂 (Dowex 50W-X8 200~400 メッシュ) 100 ml を詰めたカラムに通して、次に、純水をカラムに通してイオン交換を行った。流出液を減圧濃縮し、残渣にエタノール 250 ml を加え、生成した沈澱をろ取し、五酸化燐上で減圧乾燥して、目的化合物 3.12 g を得た。収率 90 %

白色粉末状物 $^1\text{H-NMR}$ ($\text{D}_2\text{O} + \text{NaOD}$ δ ppm) 2.55 (s, 20H) 2.75-2.83 (m, 4H) 3.07-3.15 (m, 4H) MS (FAB negative) $M-Na=435$

実施例 12

1, 2-N, N'-ビス (N'', N'''-ジ (2-スルホエチル) ビベラジノ) エタン 2 アンモニウム塩 (化合物 13) の合成

実施例 1 に示した合成法で得られた 1, 2-N, N'-ビス (N'', N'''-ジ (2-スルホエチル) ビベラジノ) エタン 3.21 g (7.75 mmol) を純水 20 ml に溶解した。この溶液を 10 % 塩化アンモニウム水溶液でアンモニウム型とした陽イオン交換樹脂 (Du

wex 50W-X8 200~400メッシュ) 100 ml を詰めたカラムに通して、次に、純水をカラムを通してイオン交換を行った。流出液を減圧濃縮し、残渣にイソプロパノール250 mlを加え、生成した沈澱をろ取し、五酸化磷上で減圧乾燥して、目的化合物3.00 gを得た。収率86% 白色粉末状物 $^1\text{H-NMR}$ ($\text{D}_2\text{O} + \text{NaOD}$ δ ppm) 2.55 (s 20H) 2.75-2.83 (m 4H) 3.07-3.15 (m 4H) MS (FAB negative) $\text{M}+1-2\text{NH}_4 = 413$

実施例 13

化合物1、2、3及び4の滴定

化合物1、2、3及び4を1 mmol秤取り、純水100 mlに溶解した。溶液をマグネチックスターラーで攪拌しながら、pHメーター(堀場製作所製 pHメーター F-1 pH電極6366-10D)でpHを測定しながら、0.1Nアンモニウム水溶液で滴定した。0.1Nアンモニウム水溶液の滴定量と溶液のpHの関係を図1に示した。この発明の優れたpH緩衝効果が認められる。

比較例 1

HEPESの滴定

実施例13に示した方法と同様な操作で滴定した。HEPESを1 mmol秤取り、純水100 mlに溶解し、0.1Nアンモニウム水溶液で滴定した。0.1Nアンモニウム水溶液の滴定量と溶液のpHの関係を図1に示した。

実施例 14

化合物1から13を用いた動物細胞培養

ハイブリドーマHB4C5細胞(1×10^5 細胞/ml)を、HEPESを含まない極東E-RDF培地(極東製薬工業社製)にITES (インシュリン5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、トランスフェリン20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、エタノールアミン20 μM 、亜セレン酸ナトリウム20 mMいずれも最終濃度)を添加した培地(以下、ITES-ERDF培地と略記する)に、化合物1から13を15 mMの濃度となるように添加した培地で、ハイブリドーマHB4C5細胞を37℃で5%炭酸ガスインキュベーター中で4日間培養した。培養後、生存細胞数をトリパンブルー法で測定した。また、培養液を遠心分離(500 \times 5分間)して得られた培養上清中の抗体(1 gM)量をELISA法で定量した。その結果を次の表3に示した。